

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
19. Februar 2004 (19.02.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/015093 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 5/06

2, A-6900 Bregenz (AT). INNOVATIONSAGENTUR
GMBH [AT/AT]; Taborstrasse 10, A-1020 Wien (AT).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT2003/000232

(22) Internationales Anmeldedatum:
11. August 2003 (11.08.2003)

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ZECH, Herbert
[AT/AT]; Grundreutweg 12, A-6900 Bregenz (AT).
DOHR, Gottfried [AT/AT]; Himmelreichweg 10A,
A-8044 Graz (AT). VANDERZWALMEN, Pierre
[BE/BE]; Av. Du Bois De Chapelle 4, B-1380 Lasne (BE).
ZECH, Nicolas [AT/AT]; Grundreutweg 12, A-6900
Bregenz (AT).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
A 1206/2002 9. August 2002 (09.08.2002) AT

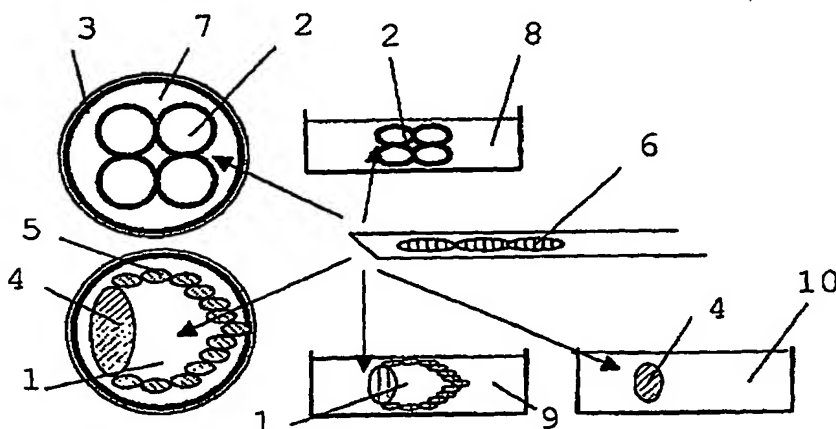
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): DR. H. ZECH GMBH [AT/AT]; Römerstrasse

(74) Anwälte: KLIMENT, Peter usw.; Singerstrasse 8,
A-1010 Wien (AT).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING CELL LINES AND ORGANS BY MEANS OF DIFFERENTIABLE CELLS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ERZEUGUNG VON ZELLINIEN SOWIE ORGANEN MITHILFE DIFFERENZIERFÄ-
HIGER ZELLEN



(57) Abstract: The invention relates to a method for the production of cell lines or individual organs, whereby differentiable donor cells are supplied to a morula or a blastocyst cultivated under conditions which enable further development of the morula or blastocyst in stages in which newly formed cell lines with a high degree of differentiation are produced, and isolation of said cell lines or further differentiation of said cell lines in organs. The inventive method is characterised in that the cells of the morula or the inner cellular mass of the blastocyst have a limited survival capacity compared to the respective wild type, or their survival capacity

is reduced by suitable conditions of cultivation, and the donor cells supplied to the morula or the blastocyst have different degrees of differentiation. Compared to conventional methods, the inventive method enables the cultivation period of the donor cells to be essentially reduced, favouring, or at least enabling, the production of natural stem cells. Another use of the blastocyst involves transferring the same into a surrogate animal.

(57) Zusammenfassung: Verfahren zur Erzeugung von Zelllinien oder einzelner Organe, wobei differenzierfähige Spenderzellen einer Morula oder Blastozyste zugeführt werden, die unter Bedingungen kultiviert werden, die eine weitere Entwicklung der Morula oder Blastozyste in Stadien, in denen neu gebildete Zelllinien mit höherem Differenzierungsgrad auftreten, sowie Isolierung dieser Zelllinien oder Weiterdifferenzierung dieser Zelllinien in Organe gestatten. Das erfindungsgemässe Verfahren zeichnet sich dadurch aus, dass die Zellen der Morula oder der inneren Zellmasse der Blastozyste über eine im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp eingeschränkte Überlebensfähigkeit verfügen oder deren Überlebensfähigkeit durch geeignete Kultivierungsbedingungen herabgesetzt wird, und die der Morula oder Blastozyste zugeführten Spenderzellen unterschiedlichen Differenzierungsgrad aufweisen. Dadurch kann im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren eine wesentlich verkürzte Kultivierungsdauer der Spenderzellen erreicht werden, wodurch die Bereitstellung natürlicher Stammzellen begünstigt, allenfalls erst dadurch ermöglicht wird. Als weitere Verwendung der Blastozyste kann auch deren Transfer in ein Leihmuttertier vorgesehen sein.

WO 2004/015093 A1



(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii) für die folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

— Erfindenerklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Verfahren zur Erzeugung von Zelllinien sowie Organen mithilfe differenzierfähiger Zellen

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Erzeugung von Zelllinien sowie Organen mithilfe differenzierfähiger Zellen gemäß dem Oberbegriff von Anspruch 1.

Ein spezieller Typus differenzierfähiger Zellen sind pluripotente Zellen, wie sie in frühen Stadien der embryonalen Entwicklung auftreten, sowie Zellen der Keimbahn. Als pluripotente Zellen werden im folgenden Zellen verstanden, die sich in jeden Zelltypus differenzieren können. Eine zu Pluripotenz vergleichbare, aber vermutlich auf Plastizität beruhende Eigenschaft kann aber auch durch technische Maßnahmen in Zellen späterer Entwicklungsstufen etwa gemäß des erfindungsgemäßen Verfahrens induziert werden. Diese Zellen sind im folgenden von der Bezeichnung „pluripotente Zellen“ nicht erfasst. Pluripotente Zellen verfügen über die Fähigkeit, alle Zelltypen des Embryos, Fötus sowie des erwachsenen Organismus zu erzeugen sowie sich selbst annähernd unbegrenzt zu erneuern. Eine erneuerbare Quelle an Zellen, die in eine Vielzahl unterschiedlicher Gewebstypen differenzieren können, bietet sicherlich vielfältige Anwendungsmöglichkeiten in der Grundlagenforschung sowie in der Transplantationstherapie. Ein wichtiger Schritt zur Verwirklichung dieses Ziels stellt die Entdeckung dar, dass menschliche, embryonale Stammzellen kultiviert werden können [3]. Unter „embryonale Stammzellen“ werden im folgenden pluripotente Zellen verstanden, die einer Morula oder Blastozyste entnommen wurden und vorzugsweise in Kulturschalen lebensfähig gehalten werden. Deren Gewinnung und Kultivierung sind dem Fachmann wohlbekannt und wurden etwa in US 6.011.197 und WO 97/37009 offenbart. Diese embryonale Stammzellen (ES-Zellen) werden dabei in erster Linie von der inneren Zellmasse

von Blastozysten gewonnen, also jener Zellen der Blastozyste, aus denen letztendlich alle Zellen des späteren Entoderms, Ektoderms und Mesoderms hervorgehen. Es sei an diesem Punkt festgehalten, dass im folgenden unter „Präembryo“ eine sich entwickelnde Zellmasse bis Tag 6 nach Befruchtung der Eizelle verstanden wird und ab dem Tag 6 und somit gegebenenfalls ab Implantation in der Gebärmutter von einem „Embryo“ gesprochen wird. Insbesondere umfasst der Begriff „Präembryo“ hier die Präimplantationsstadien von der Zygote über die Morula bis hin zur Blastozyste bis Tag 6 nach Befruchtung der Eizelle. Unter Zygote wird hier der Embryo im Einzell-Stadium (Pronukleusstadium) bezeichnet. Präimplantationsstadien können eingeleitet werden durch Befruchtung einer Eizelle durch einen Samen, durch parthenogenetische Aktivierung einer Eizelle, oder durch Zugabe einer oder mehrerer Blastomere in eine induktive Umgebung wie etwa in eine Zona Pellucida, wie dies von Alikani und Willadsen beschrieben wurde [11]. Der Begriff Morula bezieht sich hier auf alle der Zygote nachfolgenden Stadien der Zellteilungen inklusive der frühen Zellteilungsstadien am Tag 2 und 3, in denen sich noch kein Blastozoel gebildet hat. Nach Bildung eines Blastozoel wird im folgenden von einer Blastozyste gesprochen, wobei sich dieser Begriff auch auf frühe embryonale Stadien beziehen kann. Die Blastozyste wird durch die Zona Pellucida (äußere, nicht zelluläre Masse) und durch den Trophoblasten gebildet und enthält die bereits erwähnte innere Zellmasse. Nach dem Schlüpfen („hatchen“) aus der Zona Pellucida um Tag 6 wird diese Struktur ebenfalls als Blastozyste bezeichnet und ist gemäß obiger Terminologie ein Embryo. Methoden zur Isolierung einer inneren Zellmasse aus einer Blastozyste sind dem Fachmann bekannt [8, 9]. „Embryonale Stammzellen“ oder „ES-Zellen“ wären gemäß dieser Terminologie, sofern sie aus der Morula oder der Blastozyste bis Tag 6 gewonnen werden, somit eigentlich „präembryonale Stammzellen“, es wird aber die

Bezeichnung „embryonale Stammzellen“ oder „ES-Zellen“ allgemein für pluripotente Stammzellen, die aus der Morula oder Blastozyste gewonnen werden, beibehalten, auch wenn die Entnahme vor dem Tag 6 erfolgen sollte.

Das Potential von pluripotenten Zellen wie etwa ES-Zellen für die Forschung und den klinischen Einsatz ist weitreichend. Deren zukünftige Bedeutung etwa für *in vitro*-Studien der menschlichen Embryogenese, für Untersuchungen abnormaler Entwicklungen (etwa durch die Erzeugung von Zelllinien mit gezielten Genveränderungen), zur Untersuchung der Wirkung einzelner Gene, für die Entwicklung und das Testen neuer Medikamente oder als erneuerbare Quelle für Zell- und Gewebstransplantationen oder für Gentherapien sind zur Zeit noch kaum abschätzbar.

Einen weiteren Auftrieb für Forschungen dieser Art lieferte die Beobachtung, dass ES-Zellen einer ersten Spezies in die Blastozyste einer zweiten, auch unterschiedlichen Spezies eingeführt werden konnten, die nach Transfer in ein Weibchen der zweiten Spezies zur Geburt eines Nachkommens führte, der genetische Merkmale beider Spezies vereint und somit eine Chimäre darstellt, worunter im folgenden eine sich entwickelnde Zellmasse verstanden wird, die eine Untergruppe von Zellen enthält, die im Zellkern DNA mit signifikant unterschiedlicher Nukleotidbasensequenz als die anderen Zellen der Zellmasse aufweisen.

Um den genetischen Beitrag der Spender-ES-Zellen zum letztendlich resultierenden Organismus zu erhöhen, wurde etwa in US 2002062493 vorgeschlagen, nicht-humane Säugetiere zu erzeugen, indem ES-Zellen des betreffenden Tieres in tetraploide Blastozysten derselben Spezies injiziert werden. Die Blastozyste wird bis zur Entwicklung eines Embryos

kultiviert und einem Weibchen zum weiteren Austragen übertragen. In einer weiteren Ausführungsform werden die ES-Zellen mit Mutationen versehen und danach in tetraploide Blastozysten injiziert, wodurch Nachkommen mit gezielten Mutationen erzeugt werden können. Verfahren dieser Art werden ein großes Potential für die Erforschung der Wirkung einzelner Gene bzw. deren Mutationen auf die phänotypische Entwicklung von Nachkommen zugeschrieben.

Zur Erzeugung tetraploider Blastozysten werden in der Regel die Blastomere von diploiden Präembryonen im Zwei-Zell-Stadium durch Anwendung kurzer elektrischer Pulse fusioniert. Die so entstandenen Embryos können kultiviert werden und führen zur Entwicklung von Morulae und Blastozysten, wobei sich bei letzteren die Tetraploidie etwa in den Zellen der inneren Zellmasse manifestiert.

Morulae können etwa für eine Aggregation mit ES-Zellen und Blastozysten für eine Injektion von ES-Zellen verwendet werden. Tetraploide Blastozysten zeichnen sich allerdings durch eine beschränkte Entwicklungsfähigkeit aus. Während die Differenzierung tetraploider Zellen kaum über die Entwicklung von frühem Entoderm und Trophoektoderm hinausgeht, können etwa injizierte diploide ES-Zellen zur Entwicklung eines reifen Embryos führen. Daher wurde diese Methode, wie etwa in US2002062493 dargelegt, vorgeschlagen, um auf effektive Weise Chimären zu erzeugen, da durch die reduzierte Lebensdauer der tetraploiden Zellen der inneren Zellmasse die Entfaltung des Phänotypus des Wirtes auf natürliche Weise zugunsten der ES-Zellen des Spenderorganismus unterdrückt wird. Insbesondere wurde vorgeschlagen, mithilfe gentechnisch veränderter ES-Zellen auf rasche Weise den phänotypischen Beitrag bestimmter Gene zu bestimmen [1].

In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass sich alle Versuche, durch komplette Entfernung der inneren Zellmasse und dessen Ersetzen durch ES-Zellen eine normale fötale Entwicklung zu induzieren, als Fehlschlag erwiesen haben, obwohl ES-Zellen die Fähigkeit zugeschrieben wird, den gesamten Fötus zu erzeugen. Somit wird angenommen, dass die innere Zellmasse des Wirts offenbar eine entscheidende Funktion darin ausübt, die ES-Zellen zum Wiedereintritt in ein embryonales Differenzierungsprogramm zu induzieren, auch wenn es sich bei den Zellen der inneren Zellmasse um eingeschränkt lebensfähige, tetraploide Zellen handeln möge.

Die Gewinnung, Verwendung sowie genetische Veränderung von ES-Zellen stößt allerdings insbesondere bei humanen ES-Zellen auf ethische Bedenken, sodass sowohl hinsichtlich des Einsatzes von humanen Blastozysten als auch humaner ES-Zellen in Forschung und klinischer Therapie nach Alternativen zu suchen ist.

Die Verwendung embryonaler Stammzellen stößt allerdings auch auf technische Schwierigkeiten. So können diese Zellen zur Zeit etwa nur von Präembryos oder sehr frühen Embryos gewonnen werden und sind, auch wenn gegenwärtig mehrere ES-Zelllinien isoliert wurden, mit den meisten Patienten immunologisch nicht verträglich. Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, dass menschliche ES-Zellen MHC-I exprimieren [10]. Somit wird es entweder notwendig sein, eine Vielzahl weiterer ES-Zelllinien zu isolieren, oder aber ES-Zelllinien mithilfe des "therapeutischen Klonens" an jeden Patienten anzupassen. Des weiteren neigen ES-Zellen dazu, nach deren Transplantation Teratomae zu bilden. ES-Zellen müssten daher während deren Kultivierung zuverlässig in entsprechende Gewebstypen vor deren Transplantation differenziert werden. Außerdem stellt sich die Frage, ob spezialisierte Zellen, die von ES-Zellen

abgeleitet wurden, im entsprechenden Gewebe nach deren Transplantation auch die gewünschten funktionalen Eigenschaften aufweisen. So konnte etwa von Mäuse-ES-Zellen, die *in vitro* Insulin produzierten, nachgewiesen werden, dass sie *in vivo* keine Senkung des Blutzuckerspiegels bewirken konnten.

Somit rücken Alternativen zur Verwendung von ES-Zellen in den Blickpunkt des Forschungsinteresses. So stellt sich etwa die Frage, ob nicht auch adulte Stammzellen, eventuell auch aus Nabelschnurblut, als Ersatz für ES-Zellen dienen könnten, deren Gewinnung etwa aus Proben von adulten Organismen auch beim Menschen ethisch weniger bedenklich erscheint als die Gewinnung von ES-Zellen aus Präembryos oder frühen Embryos. Dies schien zunächst aufgrund der eingeschränkten Differenzierungsfähigkeit adulter Stammzellen unmöglich.

Wie jüngste Untersuchungen allerdings gezeigt haben, können bei der Aufreinigung mesenchymaler Stammzellen der Maus sogenannte MAPCs ("multipotent adult progenitor cells") gewonnen werden, --die nicht nur in mesenchymale Zellen differenzieren, sondern auch in Zellen des Entoderm, Mesoderm oder Ektoderm [2]. Werden MAPCs etwa in frühe Maus-Blastozysten injiziert, kann festgestellt werden, dass sie zur Bildung einer Vielzahl, vielleicht sogar aller somatischer Zelltypen beitragen. Diese Untersuchungen sind insofern interessant, als bis dahin angenommen wurde, dass gewebstypische Stammzellen, die sicherlich über eine geringere Fähigkeit zur Selbsterneuerung verfügen wie ES, im allgemeinen lediglich in Zellen des betreffenden Gewebes differenzieren. Zwar wurde beobachtet, dass etwa hämatopoetische Stammzellen unter Umständen auch in Zellen anderer Gewebstypen differenzieren können oder dass neuronale Stammzellen nach Injektion in eine Blastozyste zu mehreren Gewebstypen

beitragen können, dass eine einzelne gewebstypische Stammzelle allerdings in funktionale Zellen einer Vielzahl an Gewebstypen differenzieren könnte, wurde in der Regel für praktisch nicht umsetzbar gehalten. Wie des weiteren gezeigt werden konnte, tragen MAPCs *in vivo* auch zur Bildung einer Vielzahl somatischer Gewebstypen bei, wenn sie einer Maus verabreicht werden. Tatsächlich hat sich gezeigt, dass MAPCs in ihren Eigenschaften ES-Zellen ähneln und überdies hinsichtlich ihrer Differenzierungsfähigkeit einen sehr synchronen Zelltypus darstellen, wie anhand von Untersuchungen der Genexprimierung gezeigt werden konnte. Sie bedürfen etwa vergleichbarer Kulturbedingungen wie ES-Zellen, exprimieren zumindest einige der genetischen Marker, die auch bei ES-Zellen *in vitro* beobachtet werden (Oct-4, Rex-1, SSEA-1), verfügen über ausgeprägte Proliferations- und Differenzierungseigenschaften, tragen möglicherweise zur Bildung aller Organe bei, wenn sie in Blastozysten injiziert werden und differenzieren in gewebstypische Zellen, wenn sie entsprechendem Einfluss der betreffenden Organe ausgesetzt werden.

Die Natur dieser MAPCs ist zur Zeit allerdings noch ungeklärt, es scheint sogar fraglich, ob die *in vitro* beobachteten MAPCs, die das Ergebnis vergleichsweise langer Kultivierungsperioden von mehreren Monaten sind, in dieser Form auch *in vivo* existieren. So wird etwa spekuliert, dass MAPCs tatsächlich *in vivo* nicht existieren, sondern dass Zellen mit veränderten Eigenschaften, unter Umständen auch ähnlich zu denen von Krebszellen, gezüchtet wurden. Einem weiteren Erklärungsmodell zu Folge könnte die lange Kultivierungsdauer die Reduktion der ursprünglichen Zellpopulation auf enthaltene Stammzellen begünstigen, wie dies etwa bei den in ihren Eigenschaften durchaus ähnlichen hämatopoetischen Zellen beobachtet wurde.

In EP 1176189 wurde schließlich offenbart, dass aus Proben von adulten, somatischen Zellen etwa aus Muskelgewebe, Gehirngewebe, dem Blut, dem Knochenmark, der Leber oder der Brustdrüse Zellen gewonnen werden konnten, die ein den pluripotenten Stammzellen ähnliches Verhalten zeigen, insbesondere zeigen sie eine Expressierung von Oct-4, wie dies auch bei pluripotenten Stammzellen in frühen Stadien der embryonalen Entwicklung der Fall ist. Diese Zellen wurden auch als "dedifferenzierte" Stammzellen bezeichnet, um so die Vermutung auszudrücken, dass offenbar Zellen eine größere Differenzierungsfähigkeit wiedererlangen konnten. Genauere Angaben über deren Einsetzbarkeit für die Produktion differenzierter oder neuer, differenzierungsfähiger Zellen wurden aber nicht geliefert.

Es ist nun Ziel der Erfindung, ein Verfahren zur Erzeugung differenzierter oder neuer, differenzierungsfähiger Zelllinien oder auch ganzer Organe zu bieten, ohne dabei differenzierungsfähige Zellen, die aus Präembryonen oder Embryonen gewonnen werden, wie etwa ES-Zellen, zu verwenden. Es ist weiters Ziel der Erfindung, dies unter Vermeidung längerer Kultivierungsperioden der verwendeten differenzierungsfähigen Zellen zu bewerkstelligen. Abgesehen von den bereits skizzierten Risiken langer Kultivierungsperioden im Zusammenhang mit den oben erwähnten MAPCs zeichnen sich hierbei nämlich Gefahren auch aufgrund des "genetic imprinting" ab [4, 5].

Das Ziel der Erfindung wird durch die kennzeichnenden Merkmale von Anspruch 1 erreicht.

Anspruch 1 sieht dabei vor, zur Erzeugung differenzierter oder neuer, differenzierungsfähiger Zelllinien oder auch Organen keine embryonalen Stammzellen oder Stammzelllinien, die hinsichtlich

ihrer Pluripotenz über einen einheitlichen Differenzierungsgrad verfügen sollten, zu verwenden, wie dies etwa in US 6,200,806 oder in [12] beschrieben ist, sondern Zellen mit primär unterschiedlichem Differenzierungsgrad, wodurch insbesondere eine Probe eines Spenderorganismus enthaltend adulte, somatische Stammzellen charakterisiert ist. Unter „unterschiedlichem Differenzierungsgrad“ von Spenderzellen wird hier verstanden, dass sie multipotente/pluripotente oder auch differenzierte Zellen umfassen können, wobei in einer Probe adulter Zellen eines Spenderorganismus in der Regel eine relativ große Anzahl an differenzierter oder kaum mehr differenzierfähiger Zellen anzufinden sein wird und lediglich eine geringe Anzahl an Zellen noch über multipotenten/pluripotenten Charakter verfügt. Zwar handelt es sich bei den Spenderzellen durchaus um Zellpopulationen, die zur Konzentrationserhöhung enthaltener Stammzellen eine Aufbereitung mithilfe gängiger Methoden erfahren haben, etwa im Rahmen der Herstellung einer hochgereinigten Fraktion aus Nabelschnurblut, es entfällt aber die Gewinnung synchroner Zellpopulationen, also von Zellen mit einheitlichem Differenzierungsgrad, wie dies bei der Gewinnung von embryonalen Stammzelllinien der Fall ist, und der damit verbundenen langen Kultivierungsdauer.

Auch wenn es denkbar wäre, die Probe mithilfe ausreichend langer Kultivierungsperioden hinsichtlich der Differenzierfähigkeit der enthaltenen Zellen zu synchronisieren, ist dies dann nicht erforderlich, wenn sie erfindungsgemäß in Morulae oder Blastozysten eingebracht werden, deren Zellen, bei Blastozysten jene der inneren Zellmasse, über eine im Vergleich zur Wildtyp-Morula bzw. Wildtyp-Blastozyste eingeschränkte Überlebensfähigkeit verfügen, oder wenn die Überlebensfähigkeit dieser Zellen durch geeignete Kultivierungsbedingungen herabgesetzt wird.

Unter Wildtyp-Morula bzw. Wildtyp-Blastozyste wird im folgenden eine Morula oder Blastozyste verstanden, die in diesem Zusammenhang noch keine Manipulation erfahren hat. Wie bereits erwähnt wurde, übt die innere Zellmasse der Wirtsblastozyste offenbar eine entscheidende Funktion darin aus, in die Blastozyste eingefügte ES-Zellen zum Wiedereintritt in ein embryonales Differenzierungsprogramm zu induzieren, auch wenn es sich bei den Zellen der inneren Zellmasse, etwa aufgrund von Tetraploidie, um eingeschränkt lebensfähige Zellen handeln möge. Wie nun überraschend festgestellt wurde, ist es aufgrund der durch die Zellen der inneren Zellmasse, aber auch durch die Zellen der Morula, gegebenen "reprogrammierenden" Zellmatrix möglich, auch bei nicht-embryonalen Stammzellen eine "Dedifferenzierung" hinsichtlich einer größeren Differenzierfähigkeit zu bewirken. Es ist auch denkbar, dass es treffender ist, von einer "Transdifferenzierung" der zugeführten Spenderzellen zu sprechen, wobei durch deren Einbettung in eine entsprechend stimulierende zelluläre Umgebung deren Plastizität zur Entfaltung gebracht wird. Die Wirkungsweise der „Stimulierung“ ist zwar zur Zeit nicht vollends geklärt, es scheinen aber neben der extrazellulären Matrix sowohl interzelluläre, etwa autokrine und parakrine Faktoren als auch die „Polarität“ des Embryos eine Rolle zu spielen. Es liegt der vorliegenden Erfindung somit die Vorstellung zugrunde, dass mögliche Defizite hinsichtlich ihrer Differenzierfähigkeit von Stammzellen, die nicht aus Präembryos oder frühen Embryos gewonnen wurden, durch deren Kontakt mit einer entsprechenden reprogrammierenden Zellmatrix kompensiert werden können, wobei darauf Bedacht genommen werden muss, dass hinsichtlich einer optimierten Ausbeute von neugebildeten Zelllinien die Zellen der inneren Zellmasse der Blastozyste bzw. die Zellen der Morula über eine im Vergleich zur Wildtyp-Blastozyste bzw. Wildtyp-Morula eingeschränkte Überlebensfähigkeit verfügen,

oder deren Überlebensfähigkeit durch geeignete Kultivierungsbedingungen herabgesetzt wird. Somit unterstützen die Zellen der inneren Zellmasse bzw. die Zellen der Morula zwar die erwünschte Reprogrammierung der zugeführten Spender-Stammzellen, wenngleich durch deren eingeschränkte Überlebensfähigkeit ihr Anteil an den Zellen des sich entwickelnden Organismus laufend abnimmt.

Eine „eingeschränkte Überlebensfähigkeit“ der Zellen der Morula bzw. der inneren Zellmasse der Blastozyste kann auf unterschiedliche Art erfolgen. Entweder ist die eingeschränkte Überlebensfähigkeit schon „intrinsisch“ gegeben, wie etwa bei tetraploiden Embryonen, oder es kann „extrinsisch“ eine eingeschränkte Überlebensfähigkeit gewisser Zellen mithilfe geeigneter Kultivierungsbedingungen hervorgerufen werden. Auf beide Möglichkeiten wird im folgenden noch eingegangen werden.

Anspruch 2 sieht eine bevorzugte Ausführungsform vor, der zu Folge die Spenderzellen natürlich vorkommende Stammzellen enthalten. Unter „natürlich vorkommende“ Stammzellen werden hier adulte, somatische Stammzellen, auch aus Nabelschnurblut, verstanden, wie sie *in vivo* zu finden sind. Bezüglich der oben erwähnten MAPCs wurde festgestellt, dass die nach langer Kultivierungsdauer von mehreren Monaten isolierten MAPCs tatsächlich *in vivo* nicht existieren dürften, sondern dass aufgrund der langen Kultivierungsdauer Zellen mit veränderten Eigenschaften gezüchtet wurden. Es ist auch beim erfindungsgemäßen Verfahren nicht gänzlich auszuschließen, dass trotz der wesentlich kürzeren Aufbereitungs- und Kultivierungsperiode die Spenderzellen eine, im Vergleich zu den *in vivo* vorkommenden natürlichen Stammzellen, veränderte Zellpopulation darstellen. In der bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens enthalten die Spenderzellen jedoch natürlich vorkommende Stammzellen, was neben der

erfindungsgemäßen Verwendung von Spenderzellen mit unterschiedlichem Differenzierungsgrad auch durch eine rasche Aufbereitung und Kultivierung der Spenderzellen begünstigt wird.

Anspruch 3 sieht eine spezielle Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens vor, der zu Folge die Zellen der Morula oder der inneren Zellmasse der Blastozyste als Reaktionsmedium in einer Kulturschale aufbereitet sind. Es wäre aber auch denkbar, die Zellen der Morula oder der inneren Zellmasse der Blastozyste zur Aufbereitung eines Reaktionsmediums wie in [37] beschrieben, zu verwenden, da man derzeit annimmt, dass auch gelöste Matrixbestandteile wie z.B. Laminin, Kollagen-IV, Zytokine oder auch auf der Zelle vorhandene Proteine wie etwa Glykoproteine als „reprogrammierende“ Zellmatrix wirken können. Vorzugsweise wird hierzu ein Standard-Medium verwendet, das insbesondere auf die Verwendung von FCS („Fetal calf serum“) oder eines anderen, von tierischen Proteinen abgeleiteten Serum verzichtet.

Anspruch 4 sieht vor, die Spenderzellen aus Nabelschnurblut zu gewinnen, insbesondere über Herstellung einer hochgereinigten Fraktion, die etwa zu 5% Stammzellen enthält.

Anspruch 5 sieht vor, die Spenderzellen aus der Plazenta zu gewinnen. Die Plazenta enthält eine Vielzahl an Zellen, die für das erfindungsgemäße Verfahren interessant sind, wie etwa mesenchymale Zellen und Endothelzellen, von denen angenommen wird, eine besonders ergiebige Quelle für Stammzellen zu sein. Anspruch 6 sieht vor, die Spenderzellen aus dem Knochenmark zu gewinnen. Anspruch 7 sieht vor, die Spenderzellen aus dem Fettgewebe zu gewinnen, das sich als besonders interessante Quelle abzeichnet, da Stammzellen aus dem Fettgewebe relativ

leicht zu gewinnen sind. Die Gewinnung der Spenderzellen umfasst eine Aufbereitung der etwa aus einem erwachsenen Organismus entnommenen Probe, wobei die Aufbereitung darauf abzielt, die Konzentration an in der Probe enthaltenen Stammzellen zu erhöhen. Methoden dieser Art sind Stand der Technik und dem Fachmann wohlvertraut.

Anspruch 8 sieht vor, dass die Zellen der Empfänger-morula bzw. der inneren Zellmasse der Empfängerblastozyste tetraploide Zellen sind. Verfahren zur Verwirklichung einer solchen Tetraploidie sind gemäß dem Stand der Technik bekannt [6, 7]. Wie bereits erwähnt wurde, verfügen tetraploide Zellen über eine eingeschränkte Lebensfähigkeit. Aufgrund der intrinsisch gegebenen, eingeschränkten Überlebensfähigkeit der tetraploiden Zellen der Morula bzw. der inneren Zellmasse der Blastozyste nehmen diese in ihrer Anzahl allmählich ab und stellen so eine zunehmende Popularisierung der sich entwickelnden Blastozyste mit Nachfolgerzellen der zugeführten Spenderzellen sicher, wobei sie über die Zeitdauer ihres Bestehens die erforderlichen interzellulären Signale zur Reprogrammierung der zugeführten Spenderzellen hinsichtlich einer größeren Differenzierfähigkeit setzen.

Anspruch 9 sieht ein alternatives Verfahren vor, die Zellen der Morula oder der inneren Zellmasse der Blastozyste mit einer eingeschränkten Überlebensfähigkeit auszustatten, indem deren Genom ein Vektor eingeschleust wird, der eine letale Sensibilität gegenüber entsprechend gewählten Kultivierungsbedingungen verursacht. Werden nach Zufuhr der Spenderzellen zur Morula bzw. zur Blastozyste die Kultivierungsbedingungen entsprechend gewählt, hat dies ein gezieltes Absterben der Zellen der Morula bzw. der inneren Zellmasse zur Folge, ohne die Überlebensfähigkeit der Spenderzellen und der Trophoblasten zu beeinträchtigen. So

können etwa Vektoren gewählt werden, die eine höhere Sensitivität gegenüber Temperaturerhöhung oder bestimmten Zusätzen für Kulturmedien verursachen.

Alternativ dazu sieht Anspruch 10 vor, das Genom der Spenderzellen mit einem Vektor wie z.B. einem Neomycin-Resistenz-Gen oder Puromycin-Resistenz-Gen zu versehen, der eine Resistenz gegenüber Medien mit Zusätzen wie z.B. G418 oder Puromycin verursacht. Es muss hierbei aber sicher gestellt sein, dass die Einschleusung des Vektors in die Spenderzellen nicht Kultivierungszeiten bedingt, die das erfindungsgemäße Ziel von möglichst kurzen Kultivierungszeiten der Spenderzellen vor deren Zufuhr zur Blastozyste beeinträchtigt. Es können ebenfalls Vektoren zugeführt werden, die Zellen resistent gegenüber gewissen Temperatureinflüssen, wie z.B. Temperaturerhöhungen, machen [13-17].

Als weitere Alternative sieht Anspruch 11 vor, die Überlebensfähigkeit der Zellen der Morula bzw. der inneren Zellmasse der Blastozyste durch Zusatz geeigneter Antikörper zum Kulturmedium herabzusetzen. Durch Zugabe von spezifischen Antikörpern (AK), die mit zellschädigenden Substanzen beladen sind und nur an Zellen anhaften, die einen Rezeptor für den spezifischen AK besitzen, werden so nur diese Zellen geschädigt. Techniken dieser Art sind etwa in [18-22] beschrieben.

Die Verwirklichung der Ansprüche 9 bis 11 ermöglicht es, eine vorteilhafte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens gemäß Anspruch 12 zu verwirklichen, der zu Folge die Herabsetzung der Überlebensfähigkeit der Zellen der Morula bzw. der inneren Zellmasse der Blastozyste in einer auf die unterschiedlichen Differenzierungsgrade der Spenderzellen abgestimmten und zeitlich wohlgeordneten Weise erfolgt. Eine

unterschiedliche Zusammensetzung der in die Wirtsmorula bzw. Wirtsblastozyste eingeführten Spenderzellen kann nämlich bedingen, dass das Absterben der Zellen der Morula bzw. der inneren Zellmasse der Blastozyste in einer zeitlich abgestimmten Weise erfolgen muss, um eine optimierte Signalsetzung der reprogrammierenden Zellmatrix zu erzielen. Die gezielte Herabsetzung der Überlebensfähigkeit der Zellen der Morula bzw. der inneren Zellmasse muss aber darauf Rücksicht nehmen, die Trophoblasten in ihrer Überlebensfähigkeit nicht zu beeinträchtigen, da sie für das weitere Überleben des Embryos wichtig sind, insbesondere wenn die Blastozysten in ein Leihmuttertier transferiert werden.

Die aus einer Zellprobe des Spenderorganismus oder aus Nabelschnurblut gewonnene Zellprobe stellt, wie erwähnt, auch nach Reinigung der Probe hinsichtlich der Differenzierfähigkeit der enthaltenen Zellen eine asynchrone Zellpopulation dar, die nicht nur multipotente, bestenfalls auch pluripotente Stammzellen enthält, sondern auch Zellen mit geringerer Differenzierfähigkeit wie gewebstypische Zellen, die aber dennoch unter bestimmten Umständen eine Transdifferenzierung in gewebstypische Zellen anderer Gewebe vollziehen könnten, oder auch differenzierte Zellen womöglich ohne jegliche Differenzierfähigkeit. Es kann sich daher als vorteilhaft erweisen, vor dem Zuführen der Spenderzellen in die Morula bzw. Blastozyste die Spenderzellen in Kulturschalen mit anderen Blastozysten oder isolierten inneren Zellmassen anderer Blastozysten gemäß Anspruch 13 in Kontakt zu bringen. Methoden zur Isolierung und Kultivierung innerer Zellmassen sind dem Fachmann bekannt, wobei aus isolierten inneren Zellmassen letztendlich ein Medium undifferenzierter Zellen bereit wird, auf das die Spenderzellen mit hoher Kontaktwahrscheinlichkeit zu den Zellen der aufbereiteten inneren Zellmassen aufgetragen oder gespült werden können. Es

hat sich nämlich herausgestellt, dass durch den Kontakt mit Blastozysten oder isolierten inneren Zellmassen von Blastozysten eine Selektion von für das erfindungsgemäße Verfahren geeigneten Zellen hinsichtlich höherer Differenzierfähigkeit erreicht werden kann. Spenderzellen mit relativ höherer Affinität zu dem aus inneren Zellmassen aufbereiteten Medium oder den Blastozysten können isoliert werden und stehen zur weiteren therapeutischen, diagnostischen oder wissenschaftlichen Applikation zur Verfügung, könnten aber auch zur weiteren Differenzierung in Morulae oder Blastozysten injiziert werden. Im letzteren Fall wird dadurch die Wahrscheinlichkeit einer Induktion einer höheren Differenzierungsfähigkeit der injizierten Spenderzellen durch die Zellmatrix der Morula bzw. der inneren Zellmasse der Wirtsblastozyste erhöht, wobei die Zeitdauer dieses zusätzlichen Verfahrensschrittes lediglich einige wenige Minuten beträgt, im Fall eines Aufspülens der Spenderzellen auf das aus inneren Zellmassen aufbereiteten Medium auch nur wenige Sekunden, sodass auch bei Verwirklichung dieses Schrittes die Kultivierungsperioden vergleichsweise kurz gehalten werden können.

Alternativ dazu kann auch die Verwirklichung der Merkmale von Anspruch 14 vorgesehen sein, indem die Präselektion von für das erfindungsgemäße Verfahren geeigneten Zellen über entsprechende Marker erfolgt.

Die Ansprüche 15 und 16 sehen spezielle Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens dar. Insbesondere bei der Verwendung von humanen Spenderzellen und beispielsweise deren Injektion in Schwein-Blastozysten besteht über das erfindungsgemäße Verfahren die Möglichkeit, Zelllinien zu erzeugen, deren genetische Eigenschaften vergleichbar, im besten Fall ident zu jenen der ursprünglichen, humanen

Spenderzellen sind, obwohl die nach Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens sich entwickelnde Schwein-Blastozyste keineswegs genetisch ident zu den Spenderzellen ist. In einem späteren Entwicklungsstadium der Schwein-Blastozyste können neue, differenzierfähige Zellen, differenzierte Zelllinien oder auch ganze Organe mit genetischer Identität zu den humanen Spenderzellen und im Optimalfall auch immunologischer Kompatibilität zum Spenderorganismus isoliert werden, ohne dass dies den Einsatz humaner embryonaler Stammzellen erfordern würde.

Anspruch 17 sieht eine vorteilhafte Art der Zufuhr der Spenderzelle in die Wirtsblastozyste vor, indem die Zufuhr durch Injektion erfolgt.

Anspruch 18 sieht eine vorteilhafte Art der Zufuhr der Spenderzelle in die Wirtsmorula vor, indem die Zufuhr durch Aggregation erfolgt.

Anspruch 19 bezieht sich auf eine spezielle Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, der zu Folge es sich bei den Spenderzellen um humane Zellen handelt. Es ist jedoch durchaus möglich, dass die Morula oder Blastozyste, denen die Spenderzellen zugeführt werden, dennoch nicht-humanen Ursprungs sind. Da die aus dem erfindungsgemäßen Verfahren geernteten Zelllinien oder auch Organstrukturen genetisch ident zu den Spenderzellen sind, eignen sie sich zur Verwendung als Präparat zur therapeutischen Intervention gemäß der Ansprüche 20 und 21, etwa für Erkrankungen, wie sie in Anspruch 22 genannt sind.

Anspruch 23 bezieht sich auf eine spezielle Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, der zu Folge es sich bei den Spenderzellen um nicht-humane Zellen handelt. Da die aus dem

erfindungsgemäßen Verfahren geernteten Zelllinien wiederum genetisch ident zu den Spenderzellen sind, eignen sie sich zur Verwendung als Präparat zur therapeutischen und diagnostischen Intervention im Veterinärbereich gemäß Anspruch 24, sowie zur Erzeugung von genetisch identen Zellen und Organstrukturen zur therapeutischen, diagnostischen oder wissenschaftlichen Anwendung gemäß Anspruch 25, etwa für Erkrankungen, wie sie in Anspruch 26 genannt sind.

Eine mögliche Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird nun anhand der beiliegenden Figuren 1 bis 3 näher beschrieben.

Figur 1 soll hierbei schematisch darstellen, wie gemäß einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zunächst eine tetraploide Blastozyste 1 hergestellt wird. Die von der Zona Pellucida 3 umgebenen Blastomeren 2 eines Zwei-Zell-Präembryos können etwa durch Elektrofusion in einen Ein-Zell-Präembryo mit vierfachem Chromosomensatz umgewandelt werden. Techniken zur Erzeugung tetraploider Präembryonen sind gemäß dem Stand der Technik bekannt und etwa in [6, 7, 23-27] beschrieben. Der Präembryo vollzieht weiterhin Zellteilungen der Blastomeren und entwickelt sich in weiterer Folge zu einer Blastozyste 1. In Fig. 1 sind in schematischer Weise die innere Zellmasse 4 sowie die Trophoblasten 5 angedeutet.

Andererseits wird eine etwa von Nabelschnurblut stammende Probe oder auch eine von einem erwachsenen Organismus, etwa von Fettgewebe, entnommene Probe einer Aufbereitung unterzogen, die auf eine Konzentrationserhöhung der enthaltenen Stammzellen abzielt. Techniken zur Aufbereitung einer Probe zwecks Herstellung einer gereinigten Zellfraktion sind ebenfalls gemäß dem Stand der Technik bekannt und etwa in [28, 32, 34] beschrieben. Das Ergebnis der Aufbereitung sind

Spenderzellen 6 (Fig. 2), die unterschiedlichen Differenzierungsgrad aufweisen und multipotente/pluripotente oder auch differenzierte Zellen umfassen können, wobei in einer Probe adulter Zellen eines Spenderorganismus in der Regel eine relativ große Anzahl an differenzierter oder kaum mehr differenzierfähiger Zellen anzufinden sein wird und lediglich eine geringe Anzahl an Zellen noch über multipotenten/pluripotenten Charakter verfügt. Das Differenzierungspotential ist für einige Typen adulter Stammzellen gemäß dem Stand der Technik bekannt [z.B. 29, 30, 31, 34].

Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens ist nun vorgesehen, die Spenderzellen 6 nicht mithilfe ausreichend langer Kultivierungsperioden hinsichtlich der Differenzierfähigkeit der enthaltenen Zellen zu synchronisieren, sondern sie in Morulae 7 oder Blastozysten 1 einzubringen, deren Zellen 2, bei Blastozysten jene der inneren Zellmasse 4, nun aufgrund der herbeigeführten Tetraploidie über eine im Vergleich zur Wildtyp-Morula bzw. Wildtyp-Blastozyste eingeschränkte Überlebensfähigkeit verfügen (Fig. 3). Wie bereits erwähnt wurde, üben die Zellen 2 der Wirtsmorula 7 bzw. der inneren Zellmasse 4 der Wirtsblastozyste 1 offenbar eine entscheidende Funktion darin aus, eingefügte Stammzellen zum Wiedereintritt in ein embryonales Differenzierungsprogramm zu induzieren. Wie nun überraschend festgestellt wurde, ist es aufgrund der durch die Zellen der inneren Zellmasse 4, aber auch durch die Zellen 2 der Morula 7, gegebenen "reprogrammierenden" Zellmatrix möglich, auch bei nicht-embryonalen Stammzellen eine "Dedifferenzierung" hinsichtlich einer größeren Differenzierfähigkeit zu bewirken. Wie bereits erwähnt wurde, mag es treffender sein, von einer "Transdifferenzierung" der zugeführten Spender-Stammzellen 6 zu sprechen, wobei durch deren Einbettung in eine entsprechend stimulierende zelluläre

Umgebung deren Plastizität zur Entfaltung gebracht wird. Es liegt der vorliegenden Erfindung somit die Vorstellung zugrunde, dass mögliche Defizite hinsichtlich ihrer Differenzierfähigkeit von Stammzellen, die nicht aus Präembryos oder frühen Embryos gewonnen wurden, durch deren Kontakt mit einer entsprechenden reprogrammierenden Zellmatrix kompensiert werden können, wobei darauf Bedacht genommen werden muss, dass hinsichtlich einer optimierten Ausbeute von neugebildeten Zelllinien die Zellen der inneren Zellmasse 4 der Blastozyste 1 bzw. die Zellen 2 der Morula 7 über eine im Vergleich zur Wildtyp-Blastozyste bzw. Wildtyp-Morula eingeschränkte Überlebensfähigkeit verfügen. Somit unterstützen die Zellen der inneren Zellmasse 4 bzw. die Zellen 2 der Morula 7 zwar die erwünschte Reprogrammierung der zugeführten Spender-Stammzellen 6, wenngleich durch deren eingeschränkte Überlebensfähigkeit ihr Anteil an den Zellen des sich entwickelnden Organismus laufend abnimmt.

Wie ebenfalls in Fig. 3 angedeutet ist, können dabei die Zellen 2 der Morula 7 in einer Kulturschale 8 aufbereitet sein. Alternativ dazu können auch die Zellen--der inneren Zellmasse 4 der Blastozyste 1 in einer Kulturschale 10 aufbereitet sein. Des weiteren ist es denkbar, die Ko-Kultivierung auch in einer Kulturschale 9 mithilfe von entsprechend aufbereiteten Blastozysten 1 durchzuführen. Techniken zur Ko-Kultivierung von Stammzellen mit anderen Zelltypen sind etwa in [35, 36] beschrieben.

Insbesondere bei der Verwendung von humanen Spenderzellen 6 und beispielsweise deren Injektion in Schwein-Blastozysten 1 besteht über das erfindungsgemäße Verfahren die Möglichkeit, Zelllinien zu erzeugen, deren genetische Eigenschaften vergleichbar, im besten Fall ident zu jenen der ursprünglichen, humanen Spenderzellen 6 sind, obwohl die nach

Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens sich entwickelnde Schweins-Blastozyste 1 keineswegs genetisch ident zu den Spenderzellen 6 ist. In einem späteren Entwicklungsstadium der Schweins-Blastozyste 1 können neue, differenzierfähige Zellen oder differenzierte Zelllinien mit genetischer Ähnlichkeit bzw. Identität zu den humanen Spenderzellen 6 und im Optimalfall auch immunologischer Kompatibilität zum Spenderorganismus isoliert werden, ohne dass dies den Einsatz humaner embryonaler Stammzellen erfordern würde. Aus diesen Zelllinien sind Präparate für eine Vielzahl an menschlichen Erkrankungen, wie in den Ansprüchen ausgeführt, herstellbar.

Bei Transfer der Schweins-Blastozyste 1 in ein Leihmuttertier ist es auch denkbar, die Entwicklung von Organen mit genetischer Ähnlichkeit bzw. Identität zu den humanen Spenderzellen 6 und im Optimalfall auch immunologischer Kompatibilität zum Spenderorganismus zu ermöglichen. So könnte mithilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens etwa aus menschlichen Spenderzellen 6, die ohne Verwendung eines Präembryos oder Embryos gewonnen wurden, unter Verwendung einer Schweins-Blastozyste ein Herz eines Schweines aus bis zu 100% menschlichen Zellen resultieren, ohne dabei Leiden des betreffenden Tieres zu verursachen. Das Herz stünde im Optimalfall unter völliger immunologischer Kompatibilität dem Spenderorganismus zur Verfügung.

Literatur:

- [1] Wang et al., Mechanisms of Development 62 (1997), S. 137-145
- [2] Jiang et al., Nature 418, 41-49 (2002)
- [3] Thomson et al., Science 282, 1145 (1998)
- [4] Li et al., Nature 366, 362-365 (1993)

- [5] Li et al., Cell 69, 915-926 (1992)
- [6] James et al., Genet. Res. Camb. 60, 185 (1992)
- [7] Wang et al., Mech. Dev. 62, 137 (1997)
- [8] Sims & First, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 6143 (1994)
- [9] Keefer et al., Mol. Reprod. Dev. 38, 264 (1994)
- [10] Drukker et al., PNAS Vol. 99 No. 15, 9864 (2002)
- [11] Mina Alikani, Steen M Willadsen. Reproductive BioMedicine Online 2002 Vol. 5, No. 1 56-58
- [12] Smith, Annual Review, 17 S. 449, 450 (2001)
- [13] Heads RJ, Latchman DS, Yellon DM. J Mol Cell Cardiol 1994 Jun;26(6):695-9
- [14] Conneally E, Bardy P, Eaves CJ, Thomas T, Chappel S, Shpall EJ, Humphries RK. Blood 1996 Jan 15;87(2):456-64
- [15] Mehlen P, Preville X, Chareyron P, Briolay J, Klemenz R, Arrigo AP. J Immunol 1995 Jan 1;154(1):363-74
- [16] Sass H. Gene 1990 May 14;89(2):179-86
- [17] Watanabe S, Kai N, Yasuda M, Kohmura N, Sanbo M, Mishina M, Yagi T. Biochem Biophys Res Commun 1995 Aug 4;213(1):130-7
- [18] Tietze L.F. et al. Angewandte Chemie International Edition, 41, 759-761, (2002)
- [19] McDevitt MR et al. Science 2001 Nov 16;294(5546):1537-40
- [20] Tietze LF et al. Chembiochem 2001 Oct 1;2(10):758-65
- [21] Tietze LF et al. Chembiochem 2002 Mar 1;3(2-3):219-25
- [22] Tietze LF et al. Chembiochem 2001 May 4; 2(5): 326-34.
- [23] Nagy et al. Development 1990;110:815-822
- [24] Nagy A. et al. Proc Natl Acad Sci U S A 1993 Sep 15;90(18):8424-8
- [25] Eggan K. et al. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:6209-6214.
- [26] Dean et al. 1998. Development 125, pp. 2273-2282.
- [27] Amano T et al. Zygote 2001 May;9(2):153-7
- [28] Lagasse E et al. Nat Med 2000;6:1229-1234
- [29] Krause DS et al. Cell 2001;105:369-377
- [30] Galli R et al. Nat Neurosci 2000;3:986-991.
- [31] Clarke DL et al. Science 2000;288:1660-1663.

- [32] Conneally E et al. Proc Natl Acad Sci U S A 1997 Sep 2;94(18):9836-41
- [33] Pafumi C et al. Pediatr Hematol Oncol 2002 Jun;19(4):239-45
- [34] Hung SC et al. Stem Cells 2002;20(3):249-58
- [35] Mollah ZU, et al. J Invest Dermatol 2002 Mar;118(3):450-60
- [36] Buzanska L et al. J Cell Sci 2002 May 15;115(Pt 10):2131-8
- [37] Xu et al. Nat. Biotech. Vol. 19, Nr. 10 (2001)

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Erzeugung von Zelllinien oder einzelner Organe, wobei differenzierfähige Spenderzellen (6) einer nicht-humanen Morula (7) oder nicht-humanen Blastozyste (1) zugeführt werden, die unter Bedingungen kultiviert werden, die eine weitere Entwicklung der Morula (7) oder Blastozyste (1) in Stadien, in denen neu gebildete Zelllinien mit höherem Differenzierungsgrad auftreten, gestatten, sowie die Isolierung dieser Zelllinien oder Weiterdifferenzierung dieser Zelllinien in Organe durch Transfer der Blastozyste (1) in ein Leihmuttertier umfasst, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Zellen (2) der Morula (7) oder der inneren Zellmasse (4) der Blastozyste (1) über eine im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp eingeschränkte Überlebensfähigkeit verfügen oder deren Überlebensfähigkeit durch geeignete Kultivierungsbedingungen herabgesetzt wird, und die der Morula (7) oder Blastozyste (1) zugeführten Spenderzellen (6) unterschiedlichen Differenzierungsgrad aufweisen sowie nicht-embryonalen Ursprungs sind.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Spenderzellen (6) natürlich vorkommende Stammzellen enthalten.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Zellen (2) der Morula (7) oder der inneren Zellmasse (4) der Blastozyste (1) in einer Kulturschale (8, 9, 10) aufbereitet sind oder zur Aufbereitung einer löslichen Matrixfraktion dienen.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Spenderzellen (6) aus Nabelschnurblut gewonnen werden.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Spenderzellen (6) aus der Plazenta gewonnen werden.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Spenderzellen (6) aus dem Knochenmark gewonnen werden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Spenderzellen (6) aus dem Fettgewebe gewonnen werden.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Zellen (2) der Morula (7) oder der inneren Zellmasse (4) der Blastozyste (1) tetraploide Zellen sind.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Zellen (2) der Morula (7) oder der inneren Zellmasse (4) der Blastozyste (1) Zellen aufweist, deren Genom Vektoren enthält, die im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp eine letale Sensibilität gegenüber entsprechenden Kultivierungsbedingungen verursachen.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Genom der Spenderzellen (6) einen Vektor enthält, der eine Resistenz gegen Zusätze für Kulturmedien verursacht.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Überlebensfähigkeit der Zellen (2) der Morula (7) oder der inneren Zellmasse (4) der Blastozyste (1) durch Zusatz geeigneter Antikörper herabgesetzt wird.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Herabsetzung der Überlebensfähigkeit der Zellen (2) der Morula (7) oder der Zellen der inneren Zellmasse (4) der Blastozyste (1) in einer auf die unterschiedlichen Differenzierungsgrade der Spenderzellen (6) abgestimmten und zeitlich wohlgeordneten Weise erfolgt.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass vor dem Zuführen der Spenderzellen (6) in die Morula (7) oder der Blastozyste (1) die Spenderzellen (6) in Kulturschalen mit anderen Blastozysten oder aus anderen Blastozysten isolierten inneren Zellmassen in Kontakt gebracht werden, jene Spenderzellen mit relativ höherer Kontaktaffinität isoliert und der Morula (7) bzw. erstgenannten Blastozyste (1) zugeführt werden.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass vor dem Zuführen der Spenderzellen (6) in die Morula (7) oder Blastozyste (1) die Spenderzellen (6) mit einem genetischen Marker ausgestattet werden, die eine Isolierung von Zellen mit niedrigerem Differenzierungsgrad und deren Zuführen in die Morula (7) oder Blastozyste (1) gestatten.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass es sich bei der Morula (7) oder

Blastozyste (1) um eine Maus-Morula oder Maus-Blastozyste handelt.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass es sich bei der Morula (7) oder Blastozyste (1) um eine Schwein-Morula oder Schwein-Blastozyste handelt.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, **dadurch gekennzeichnet**, dass bei Zufuhr der Spenderzellen (6) zu einer Blastozyste (1) die Zufuhr durch Injektion erfolgt.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, **dadurch gekennzeichnet**, dass bei Zufuhr der Spenderzellen (6) zu einer Morula (7) die Zufuhr durch Aggregation erfolgt.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, **dadurch gekennzeichnet**, dass es sich bei den Spenderzellen (6) um humane Spenderzellen handelt.
20. Verwendung von gemäß Anspruch 19 erzeugten Zelllinien als Präparat zur diagnostischen und therapeutischen Intervention und für wissenschaftliche Zwecke bei Erkrankungen des Menschen.
21. Verwendung von gemäß Anspruch 19 erzeugten Zelllinien zur Erzeugung von Organstrukturen zur therapeutischen, diagnostischen oder wissenschaftlichen Anwendung bei Erkrankungen des Menschen.
22. Verwendung von gemäß Anspruch 19 erzeugten Zelllinien nach Anspruch 20 oder 21, **dadurch gekennzeichnet**, dass es sich bei den Erkrankungen des Menschen um

Herz/Kreislaufkrankungen, neurologische Erkrankungen, Fortpflanzungsstörungen, Krebs, Augenerkrankungen, hormonelle Störungen, Lungenerkrankungen, metabolische Störungen, vererbte Erkrankungen, Erkrankungen des Bewegungs-, Stütz- und Bandapparates, Erkrankungen der Haut, des Knorpels und des Knochens, sowie Autoimmunstörungen handelt.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, **dadurch gekennzeichnet**, dass es sich bei den Spenderzellen (6) um Spenderzellen nicht-humaner Säugetiere handelt.
24. Verwendung von gemäß Anspruch 23 erzeugten Zelllinien als Präparat zur diagnostischen und therapeutischen Intervention und für wissenschaftliche Zwecke bei Erkrankungen nicht-humaner Säugetiere.
25. Verwendung von gemäß Anspruch 23 erzeugten Zelllinien zur Erzeugung von Organstrukturen zur therapeutischen, diagnostischen oder wissenschaftlichen Anwendung bei Erkrankungen nicht-humaner Säugetiere.
26. Verwendung von gemäß Anspruch 23 erzeugten Zelllinien nach Anspruch 24 oder 25, **dadurch gekennzeichnet**, dass es sich bei den Erkrankungen des Säugetiers um Herz/Kreislaufkrankungen, neurologische Erkrankungen, Fortpflanzungsstörungen, Krebs, Augenerkrankungen, hormonelle Störungen, Lungenerkrankungen, metabolische Störungen, vererbte Erkrankungen, Erkrankungen des Bewegungs-, Stütz- und Bandapparates Erkrankungen der Haut, des Knorpels und des Knochens, sowie Autoimmunstörungen handelt.

Fig. 1

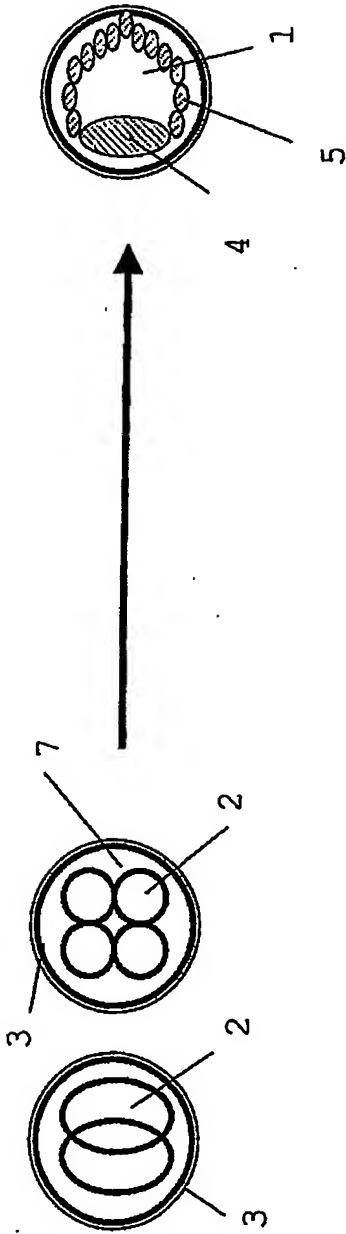


Fig. 2

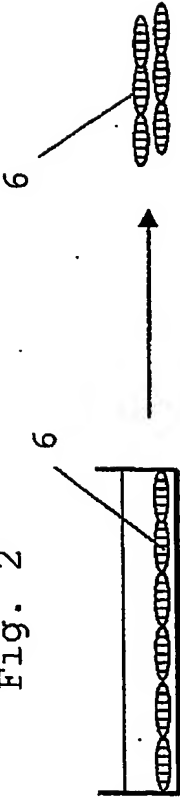
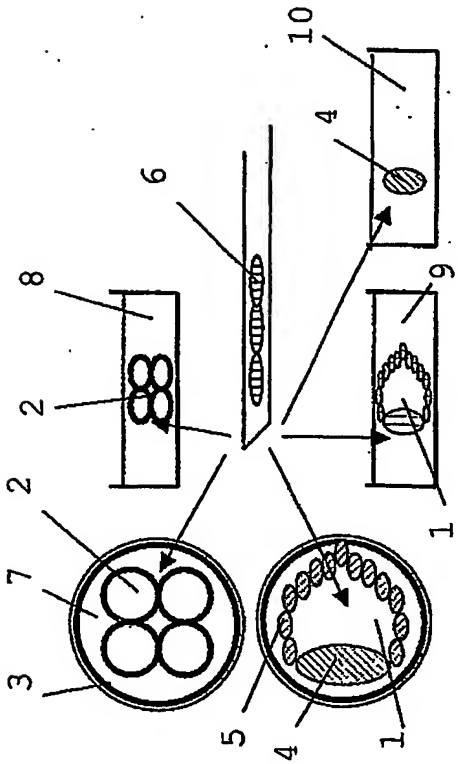


Fig. 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/AT 03/00232

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01 11011 A (REYES MORAYMA ; FURCHT LEO T (US); VERFAILLIE CATHERINE M (US)) 15 February 2001 (2001-02-15) page 59-62	20-22, 24-26
A	-----	1-19, 23
X	EP 1 176 189 A (UNIV GRONINGEN ; FORNIX BIOSCIENCES N V (NL)) 30 January 2002 (2002-01-30) paragraphs '0019!-'0021!; claims	20-22, 24-26
A	-----	1-19, 23
A	WO 02 051980 A (ZAHNER JOSEPH E ; NUCLEUS REMODELING INC (US); SHARDA ASUTOSH N (US)) 4 July 2002 (2002-07-04) the whole document	1-26



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 January 2004

Date of mailing of the international search report

19/01/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kalsner, I

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/AT 03/00232

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0111011	A	15-02-2001	AU 6621800 A CA 2381292 A1 EP 1226233 A2 JP 2003506075 T WO 0111011 A2	05-03-2001 15-02-2001 31-07-2002 18-02-2003 15-02-2001
EP 1176189	A	30-01-2002	EP 1176189 A1 AU 8631501 A CA 2416682 A1 EP 1301590 A2 WO 0208388 A2 US 2003219866 A1	30-01-2002 05-02-2002 31-01-2002 16-04-2003 31-01-2002 27-11-2003
WO 02051980	A	04-07-2002	US 2002136709 A1 WO 02051980 A2	26-09-2002 04-07-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 03/00232

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N5/06

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 01 11011 A (REYES MORAYMA ;FURCHT LEO T (US); VERFAILLIE CATHERINE M (US)) 15. Februar 2001 (2001-02-15)	20-22, 24-26
A	Seite 59-62	1-19,23
X	EP 1 176 189 A (UNIV GRONINGEN ;FORNIX BIOSCIENCES N V (NL)) 30. Januar 2002 (2002-01-30)	20-22, 24-26
A	Absätze '0019!-'0021!; Ansprüche 19,20,22,23	1-19,23
A	WO 02 051980 A (ZAHNER JOSEPH E ;NUCLEUS REMODELING INC (US); SHARDA ASUTOSH N (US)) 4. Juli 2002 (2002-07-04) das ganze Dokument	1-26

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

12. Januar 2004

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

19/01/2004

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Kalsner, I

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 03/00232

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0111011 A	15-02-2001	AU 6621800 A	05-03-2001
		CA 2381292 A1	15-02-2001
		EP 1226233 A2	31-07-2002
		JP 2003506075 T	18-02-2003
		WO 0111011 A2	15-02-2001
EP 1176189 A	30-01-2002	EP 1176189 A1	30-01-2002
		AU 8631501 A	05-02-2002
		CA 2416682 A1	31-01-2002
		EP 1301590 A2	16-04-2003
		WO 0208388 A2	31-01-2002
		US 2003219866 A1	27-11-2003
WO 02051980 A	04-07-2002	US 2002136709 A1	26-09-2002
		WO 02051980 A2	04-07-2002